

L3 ANSWER 55 OF 63 CAPLUS COPYRIGHT 2007 ACS on STN
AN 1978:94812 CAPLUS
DN 88:94812
TI Amylase inhibitor
IN Woeber, Guenter; Woeber, Guenter
PA Fed. Rep. Ger.
SO Ger. Offen., 7 pp.
CODEN: GWXXBX
DT Patent
LA German
FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	DE 2628757	A1	19771229	DE 1976-2628757	19760626
PRAI	DE 1976-2628757	A	19760626		

AB An α - amylase [9000-90-2] inhibitor, specific for pancreas and saliva α -amylase, is extracted from bean (Phaseolus vulgaris) seeds or whole plants, using dilute mineral acids. The inhibitor can be used in the therapy of obesity, diabetes, and atherosclerosis, due to its inhibition of the digestion of dietary starch [9005-25-8]. Thus, the inhibitor was extracted from dried bean seeds with 0.01M H₂SO₄. The extract was heated to 70° and centrifuged at 10,000 g. The supernatant was dialyzed, and the 40-65% (NH₄)₂SO₄ fraction of the retentate was dialyzed and further purified by mol. sieve chromatog. on Acrylex P 100.

[First Hit](#) [Previous Doc](#) [Next Doc](#) [Go to Doc#](#)**End of Result Set**☐ **Generate Collection** **Print**

L3: Entry 3 of 3

File: DWPI

Dec 29, 1977

DERWENT-ACC-NO: 1978-02409A
DERWENT-WEEK: 197802
COPYRIGHT 2007 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Amylase inhibitor from Phaseolus vulgaris - active against amylase from saliva or pancreas, does not inhibit alpha-amylase from e.g. Bacillus subtilis

INVENTOR: WOBER, G

PATENT-ASSIGNEE: WOBER G (WOBEI)

PRIORITY-DATA: 1976DE-2628757 (June 26, 1976)

Search Selected**Search ALL****Clear**

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
<input type="checkbox"/> <u>DE 2628757 A</u>	December 29, 1977		000	

INT-CL (IPC): A61K 37/64; C07G 7/00

ABSTRACTED-PUB-NO: DE 2628757A
BASIC-ABSTRACT:

A new amylase inhibitor (I) of polypeptide character has high activity against amylase from saliva or the pancreas, but does not inhibit alpha-amylase from Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens or Aspergillus oryzae. (I) is obtd. from Phaseolus vulgaris

(I) is pref. prepd. by extracting bean-flour (from the seeds or green fruit) with 1.5-7 pts. wt. of 0.001-0.02 N aq. H2SO4, centrifuging, heating the liq. 10-30 min. at 65-80 degrees C, centrifuging again, dialysing and isolating (I) by lyophilisation.

(I) reduces starch formation from carbohydrate-rich foodstuffs and can therefore be used in the treatment of adipositas, atherosclerosis, diabetes and prediabetes.

ABSTRACTED-PUB-NO: DE 2628757A
EQUIVALENT-ABSTRACTS:

DERWENT-CLASS: B04
CPI-CODES: B04-B04F; B12-H03; B12-H05;

[Previous Doc](#) [Next Doc](#) [Go to Doc#](#)

⑤

Int. Cl. 2:

C 07 G 7/00

A 61 K 37/64

⑩ **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**



DT 26 28 757 A 1

⑪

Offenlegungsschrift 26 28 757

⑫

Aktenzeichen:

P 26 28 757.0

⑬

Anmeldetag:

26. 6. 76

⑭

Offenlegungstag:

29. 12. 77

⑮

Unionspriorität:

⑯ ⑰ ⑱ —

⑤④

Bezeichnung:

Amylase Inhibitor

⑦①

Anmelder:

Wöber, Günter, Dr., 3550 Marburg; Arendes, Josef, Dipl.-Chem.,
5810 Witten

⑦②

Erfinder:

gleich Anmelder

DT 26 28 757 A 1

Patentansprüche

- ① Amylase-Inhibitor von Polypeptidcharakter aus Phaseolus vulgaris mit hoher Aktivität gegen Pankreas- und Speichel-Amylase, der α -Amylase aus Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens und Aspergillus oryzae nicht hemmt.
- 2) Verfahren zur Herstellung des Amylase-Inhibitors nach Anspruch 1) dadurch gekennzeichnet, daß Bohnenmehl mit wässerigen Säuren extrahiert und der Amylase-Inhibitor aus dem Extrakt nach an sich bekannten Methoden isoliert wird.
- 3) Verfahren zur Herstellung des Amylase-Inhibitors nach Anspruch 1) dadurch gekennzeichnet, daß Bohnenmehl mit 1,5 - 7 Gewichtsteilen 0,001 - 0,02 N wässriger Schwefelsäure extrahiert wird, das Extrakt nach Zentrifugieren 10 - 30 Minuten auf 65 - 80 °C erwärmt wird, nach Zentrifugieren dialysiert und durch Lyophilisieren isoliert wird.
- ~~4) Verwendung des Amylase-Inhibitors nach Anspruch 1) zur Hemmung oder Verzögerung der Verdauung von Stärke und Glykogen.~~

geprüft Am 13.9.76

Amylase-Inhibitor aus ~~Phaseolus vulgaris~~

In der Natur sind hochmolekulare Hemmstoffe hydrolytischer Enzyme weit verbreitet. Solche Inhibitoren sind meist Proteine, die selektiv einzelne Enzyme hemmen. Am besten bekannt sind heute Inhibitorproteine proteolytischer Enzyme. Inhibitoren anderer hydrolytischer Enzyme sind bisher weit weniger detailliert untersucht worden als die Proteinase-Inhibitoren. Eine Ausnahme bilden die α -Amylase-Inhibitoren aus Pflanzen, deren Existenz schon lange bekannt ist, die aber erst in den letzten Jahren intensiver erforscht wurden. In der DOS 2003934 wird ein α -Amylase-Inhibitor aus Weizen beschrieben und beansprucht.

Es wurde nun gefunden, daß sich mit wässerigen, verdünnten Säuren, vorzugsweise wässerigen verdünnten Mineralsäuren, wie HCl, H₂SO₄ oder H₃PO₄, oder vor allem bei sauren pH-Werten, aus Bohnen (Bohnenmehl, Phaseolus vulgaris) ein hochaktiver Inhibitor der Amylase aus Pankreas oder Speichel in hohen Ausbeuten extrahieren und in einfacher Weise rein darstellen läßt. Der Grad der Hemmung der beiden Amylasen durch den Inhibitor ist identisch. Der Inhibitor zeigt keine Wirkung gegen die Amylase aus folgenden Quellen: α -Amylase aus den Bakterien Bacillus subtilis und Bacillus amyloliquefaciens sowie α -Amylase aus dem Pilz Aspergillus oryzae.

In verschiedenen Bohnenarten (Phaseolus vulgaris) ist Inhibitoraktivität gegen α -Amylase enthalten. Diese Aktivität ist nicht nur aus den Samen, sondern auch aus grünen Früchten extrahierbar.

Der Inhibitor ist farblos und löst sich gut in Wasser, verdünnten Säuren und Laugen. Der Inhibitor wird durch Dialyse nicht verändert, besitzt ein Molekulargewicht von etwa 64 000 und wird durch Proteinasen langsam inaktiviert. Wässerige Lösungen des Inhibitors sind zwischen pH 1 und pH 8 bei Zimmertemperatur und bis zu etwa 80 °C relativ stabil. Erhitzen einer wässerigen Lösung auf 100 °C bzw. Inkubation im alkalischen pH-Bereich verursacht Aktivitätsverlust. Das pH-Optimum für die Inhibitoraktivität liegt bei pH 5,5.

Die quantitative Messung der Inhibitoraktivität beruht auf der Bestimmung der Restaktivität an im Inkubationsansatz im Überschuß befindlicher α -Amylase. α -Amylase-Aktivität wird durch Messung der Zunahme reduzierender Endgruppen, die durch Hydrolyse löslicher Stärke entstehen, bestimmt. Die Freisetzung reduzierender Endgruppen wird mit Hilfe eines alkalischen Kupferreagenz in Modifikation einer von Nelson beschriebenen Methode kolorimetrisch verfolgt. Mit bekannten Mengen eines reduzierenden Zuckers (Maltose) wird eine Eichkurve aufgestellt. Eine Amylaseeinheit ist definiert als die Menge Enzym, die unter den angegebenen Testbedingungen 1 μ Mol reduzierender Endgruppen pro Minute freisetzt. Eine Inhibitoreinheit ist definiert als die Menge Inhibitor, die eine Amylaseeinheit vollständig hemmt. Da die vollständige Hemmung asymptotisch erreicht wird, wird der Wert einer Inhibitoreinheit abgeleitet von jener Menge Inhibitor, die benötigt wird, um die Aktivität von 2 Amylaseeinheiten auf 1 Amylaseeinheit zu reduzieren, d. h. eine 50 %ige Hemmung von 2 Amylaseeinheiten verursacht. Zur Durchführung des Tests werden geeignete Mengen an α -Amylase und Inhibitor, gelöst in 0,5 ml 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,0, der 0,15 M an NaCl ist, bei 37 °C 10 Minuten inkubiert. Anschließend wird als Substrat 0,5 ml einer vorgewärmten 1 %igen gepufferten Stärkelösung (lösliche Stärke, Artikel 1253 der Firma Merck, Darmstadt) zugegeben und 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation wird durch Zugabe von 1 ml alkalischer Kupfertartratlösung beendet und 20 Minuten am siedenden Wasserbad erhitzt (Reagenz C der modifizierten Methode zur Bestimmung reduzierender Endgruppen nach Robyt, J. F. und Whelan, W. J. in: Starch and its derivatives (Radley, J. A., Herausgeber), Chapman & Hall, London 1968. Nach dem Abkühlen wird der Reaktionsmischung 0,5 ml Reagenz D zur Farbentwicklung zugesetzt. Die Extinktion bei 520 nm wird gegen eine Blindinkubation ohne α -Amylase gemessen. Erfolgt parallel die Inkubation identischer Mengen an α -Amylase mit und ohne Inhibitor, so kann die Auswertung der Resultate in der Form einer prozentualen Hemmung der eingesetzten Amylase erfolgen.

Die Extraktion des erfindungsgemäßen Inhibitors aus Bohnenmehl erfolgt erfindungsgemäß mit 0,001 bis 0,02 N wässrigen Säuren,

- 2 -
4

2628757

vorzugsweise Mineralsäuren, insbesondere Schwefelsäure.

Dazu wird ein Gewichtsteil Bohnenmehl mit etwa 1,5 - 7 Gewichtsteilen, vorzugsweise etwa 2-4 Gewichtsteilen des entsprechenden Extraktionsmediums versetzt, 1-2 Minuten homogenisiert und anschließend 0,5 - 4 Stunden (vorzugsweise 1-2 Stunden) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) gerührt. Danach wird der Ansatz filtriert oder 20 Minuten bei mindestens 10 000 x g zentrifugiert. Der Rückstand wird mit 1-2 Gewichtsteilen des Extraktionsmediums, wie oben beschrieben, reextrahiert und zentrifugiert bzw. filtriert. Die Überstände bzw. Filtrate werden vereinigt.

Die Isolierung des Inhibitors aus den jeweiligen Extraktionslösungen geschieht erfindungsgemäß wie folgt:
Die Extraktionslösung wird einer Hitzebehandlung bei 65 - 80 °C für 10-30 Minuten unterworfen. Nach der Hitzebehandlung wird erneut bei mindestens 10 000 x g zentrifugiert und der Überstand in an sich üblicher Weise dialysiert. Besonders günstig ist es, gegen etwa das dreifache Volumen an 0,02 M Tris/HCl-Puffer bei pH 7,0 zu dialysieren. Die weitere Reinigung, kann, falls gewünscht, durch Ammoniumsulfat-Fraktionierung erfolgen, wobei der Inhibitor zwischen 40 %iger und 65 %iger Sättigung an Ammoniumsulfat ausfällt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, in 0,02 M Tris/HCl-Puffer gelöst und gegen etwa das dreifache Volumen des Puffers dialysiert. Wenn gewünscht, kann noch weiter gereinigt werden und zwar in üblicher Weise durch Chromatographie auf Molekularsieben, z. B. Polyacrylamidgelen (Acrylex P-100 der Firma Macherey & Nagel, Düren) mit 0,02 M Tris/HCl-Puffer als Elutionsmittel. Nach Vereinigung der Inhibitorfraktionen und Dialyse gegen vollentsalztes Wasser, wird der Inhibitor durch Lyophilisieren gewonnen.

Die Amylasen aus Speichel und Pankreas von Säugetieren sind bekanntlich am Abbau der Stärke aus kohlenhydratreicher Nahrung beteiligt. Im Verdauungstrakt werden α -Glucane unter Beteiligung von Amylasen bis zu Glucose abgebaut und in dieser Form resorbiert. (alimentäre Hyperglykämie). Aufgrund der Spezifität des erfindungsgemäßen, nach obigen Methoden isolierten Inhibitors als Hemmstoff der Amylasen aus Speichel und Pankreas, kann der Inhibitor den

709852/0538

-1-5

2628757

Abbau der Stärke aus kohlenhydratreichen Nahrungsmitteln vermindern. Der Inhibitor ist daher als Therapeutikum zur Behandlung von Adipositas, Atherosklerose, Diabetes und Prädiabetes geeignet.

Für die vorstehend angegebenen Verwendungen ist es in der Regel ausreichend, den Inhibitor zu verwenden, wie er nach der Hitzebehandlung erhalten wird, ohne ihn weiter aufzureinigen. Dazu wird der Inhibitor nach der Dialyse, die an die Hitzebehandlung anschließt, durch Lyophilisieren gewonnen.

Beispiel 1

100 g grüne Stangenbohnen (Phaseolus vulgaris) oder grüne Buschbohnen (Phaseolus vulgaris) vom örtlichen Markt werden in flüssiger Luft zerkleinert. Zur Extraktion des Inhibitors wird mit 500 ml 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 4,0 im Mixer homogenisiert und anschließend 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zentrifugation (20 Minuten bei 20 000 x g wird der Überstand unter Rühren 15 Minuten auf 70 °C erhitzt. Durch nochmaliges Zentrifugieren werden ausgefallene Proteine entfernt, der Überstand wird 8 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert und lyophilisiert oder weiter gereinigt.

Beispiel 2

100 g handelsübliche weiße Bohnen (Phaseolus vulgaris) aus einem Supermarkt werden gemahlen und 2 Stunden mit 500 ml destilliertem Wasser gerührt. Nach dem Abzentrifugieren (20 Minuten, 20 000 x g) wird der Rückstand erneut mit 200 ml destilliertem Wasser gerührt und wie zuvor zentrifugiert. Die beiden löslichen Extrakte werden vereinigt und 15 Minuten unter Rühren auf 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen werden die denaturierten Proteine durch Zentrifugation entfernt. Die Lösung wird über Nacht gegen destilliertes Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert oder weiter gereinigt.

Beispiel 3

100 g Bohnenmehl (Phaseolus vulgaris) wird mit 300 ml einer 0,15 M NaCl-Lösung 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zentrifugation wird der Rückstand nochmals mit der

709852/0538

- 8 -
6

gleichen Menge einer 0,15 M NaCl-Lösung 1 Stunde gerührt. Vom Unlöslichen wird abzentrifugiert und die beiden Extrakte werden vereinigt. Der Rohextrakt wird einer Hitzebehandlung unterworfen (15 Minuten 80 °C) und anschließend zentrifugiert. Die Lösung wird über Nacht gegen Leitungswasser dialysiert, sodann lyophilisiert oder weiter gereinigt.

Beispiel 4

500 g gemahlene weiße Bohnen (Phaseolus vulgaris) werden mit 1 l 0,01 M wässriger Schwefelsäurelösung 2 Stunden gerührt. Man zentrifugiert ab und wiederholt die Extraktion auf die angegebene Weise. Die beiden Extrakte werden vereinigt, 15 Minuten unter Rühren auf 70 °C erhitzt und anschließend 30 Min. bei 10 000 x g zentrifugiert. Niedermolekulare Bestandteile im Überstand werden durch Dialyse gegen das fünffache Volumen an 0,02 M Tris/HCl-Puffer pH 7,0 entfernt. Das Dialysat wird mit festem Ammoniumsulfat unter Rühren auf 40 %ige Sättigung gebracht, wobei der pH-Wert 7,0 eingehalten wird. Nach 2 Stunden wird der gebildete Niederschlag abzentrifugiert (20 Minuten 10 000 x g) und verworfen. Durch weitere Zugabe von festem Ammonsulfat wird die Sättigung auf 65 % erhöht. Nach 2 Stunden wird der Niederschlag durch Zentrifugation gesammelt, in 0,02 M Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst und gegen das zehnfache Volumen des gleichen Puffers dialysiert. Die weitere Reinigung des Inhibitors erfolgt durch Molekularsiebchromatographie an dem Polyacrylamidgel Acrylex P 100. Als Elutionspuffer dient wiederum 0,02 M Tris/HCl-Puffer pH 7,0. Die Fraktionen mit Inhibitoraktivität werden vereinigt, gegen Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert.